Les publications de la Direction de l'innovation et des technologies

Document d'information

Production de salmonidés monosexes femelles et stériles

RICHARD MORIN, BIOLOGISTE
STATION TECHNOLOGIQUE PISCICOLE DES EAUX DOUCES

mise à jour : octobre 2001

Table des matières

1. Pourquoi produire des poissons monosexes femelles et stériles? 1
2. La production de reproducteurs néomâles 2
3. Incorporation de l'hormone dans la moulée 3
4. Nourrissage des poissons avec la moulée contenant l'hormone 3
5. Poursuite de l'engraissement des poissons jusqu'à la fraye 4
6. Sélection des néomâles 4
7. Utilisation de la laitance des néomâles pour la fécondation des oeufs 4
8. Test de motilité des spermatozoïdes 5
9. Stérilisation 5
10. Références 6

1. Pourquoi produire des poissons monosexes femelles et stériles?

La production des salmonidés monosexes femelles et la stérilisation sont des techniques piscicoles qui visent à éliminer les problèmes de croissance et de détérioration de la qualité de la chair reliés à la maturation sexuelle des poissons. Ces problèmes sont rencontrés quand les poissons n'atteignent pas la taille suffisante pour la mise en marché avant la maturité sexuelle. En l'occurrence, la production de truites de grande taille nécessite une longue période de croissance, où les poissons dépassent alors l'âge de la puberté et atteignent la maturité sexuelle.

La maturation sexuelle ralentit considérablement la croissance des poissons et amène aussi une détérioration progressive de la qualité de la chair, laquelle perd sa fermeté et son bon goût. En plus, la chair perd sa teinte orangée, si caractéristique des salmonidés, parce que les pigments caroténoïdiens qui la colorent normalement migrent à l'extérieur du muscle pour s'accumuler dans les œufs et sur la peau du poisson. En pleine période de maturité, la chair de la truite devient blanche et totalement inacceptable à la consommation en regard des critères de qualité recherchés pour les salmonidés. Les pisciculteurs doivent retarder la vente de ces poissons. Heureusement, après la période de reproduction, les truites reprennent leur rythme de croissance et leur chair retrouve sa fermeté et sa coloration orangée. La truite redevient alors excellente à la consommation, mais cela peut prendre plusieurs semaines à quelques mois.

La maturation sexuelle des truites en élevage apporte des contraintes majeures pour la production et la mise en marché, qui se soldent par des coûts importants pour les pisciculteurs. Cependant, ces contraintes peuvent être surmontées par la production de poissons monosexes femelles et par leur stérilisation.

Québec

Dans bien des cas, la production de salmonidés monosexes femelles est suffisante pour solutionner les problèmes. En effet, la maturation sexuelle chez les salmonidés se manifeste de façon précoce, en général chez les mâles une année avant les femelles. Or, la production de poissons monosexes femelles permet souvent de mettre en marché ces poissons à la taille désirée avant la maturité sexuelle des femelles, les mâles étant totalement absents. C'est le cas par exemple de la truite arc-en-ciel, qui atteint la taille recherchée pour le marché de 1 kg, avant l'âge de 3 ans, où femelles et mâles sont matures. Pendant la deuxième année, il n'y a que les mâles arc-en-ciel qui présentent un problème de maturation précoce, lesquels peuvent être éliminés complètement par l'utilisation d'un cheptel composé à 100 % de femelles.

Chez la l'omble de fontaine, qui mature une année plus tôt que la truite arc-en-ciel, il est nécessaire de stériliser les poissons pour qu'ils atteignent la taille recherchée pour le marché de la consommation avant la puberté. Dans ces cas où la stérilisation des salmonidés est requise, la production de poissons monosexes femelles doit être réalisée au préalable parce que cette technique n'est efficace que chez les femelles. En effet, les mâles même stériles présentent des caractères sexuels secondaires indésirables tels qu'un ralentissement de croissance et une détérioration significative de la qualité de la chair.

2. La production de reproducteurs néomâles

Le sexe des salmonidés, comme chez les mammifères, est déterminé par le mâle lors de la fécondation (Benfey *et al* 2000). Dans les conditions normales, la moitié des spermatozoïdes contiennent un chromosome Y et l'autre moitié un chromosome X. Les œuf ne contiennent que le chromosome X. Un seul spermatozoïde féconde l'œuf, qui devient mâle en présence du chromosome Y ou femelle en présence du chromosome X (Figure 1).

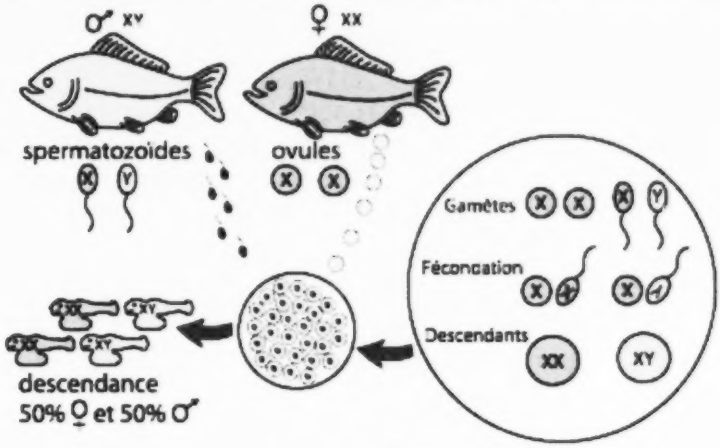


Figure 1 Déterminisme du sexe dans les conditions d'une fécondation normale

Une population monosexe femelle de salmonidés est obtenue en fécondant des œufs avec du sperme provenant de néomâles, soit des femelles transformées en mâles. Les néomâles sont obtenus au moyen de l'administration d'une hormone masculinisante chez de tout jeunes poissons, avant que la différenciation sexuelle ne soit encore réalisée. En effet, les salmonidés présentent la particularité de naître asexués sur le plan physiologique, c'est-à-dire qu'une population d'alevins est constituée normalement de 50 % de mâles génétiques (alevins porteurs du chromosome Y dans chacune de leurs cellules) et de 50 % de femelles génétiques (alevins porteurs du chromosome X dans chacune de leurs cellules), mais les organes génitaux et les caractères sexuels secondaires ne sont pas développés. Peu après le début de l'alimentation, le système hormonal lié aux chromosomes sexuels portés par l'animal se mettra en place entraînant l'apparition des caractères sexuels mâles chez les mâles génétiques et femelles chez les femelles génétiques. Cette particularité permet de se substituer au système hormonal de l'animal et d'induire le développement des organes génitaux mâles chez les femelles génétiques. Un lot d'alevins, composé en proportion égale de mâles et de femelles génétiques, est nourri avec une moulée contenant de l'hormone masculinisante (la testostérone) pendant environ 3 mois (Figure 2). Le traitement masculinisant dure 80 jours à 8 °C chez la truite arc-en-ciel. Les mâles génétiques qui reçoivent cette hormone n'en sont pas affectés, alors que les femelles génétiques, pour un bon pourcentage, seront transformées en mâles physiologiques, c'est-à-dire qu'ils développeront à l'âge de la maturité sexuelle des organes sexuels mâles.

Par la suite, ces poissons sont engraissés normalement pendant 2 à 3 ans pour devenir des reproducteurs. À l'âge de la maturité sexuelle, les mâles génétiques et

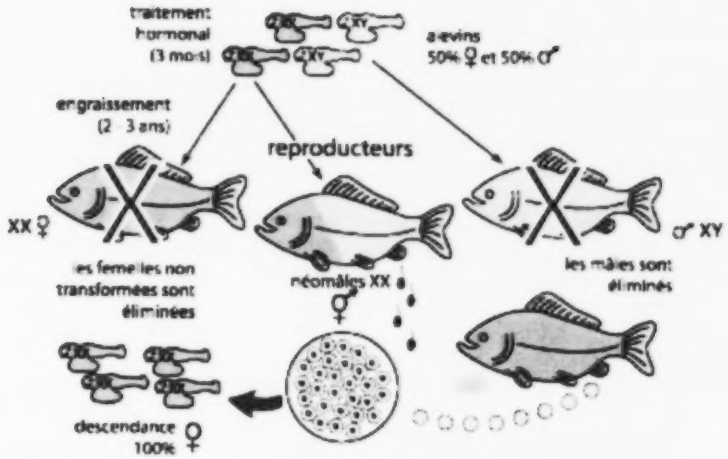


Figure 2 Schéma illustrant les étapes conduisant à la production d'une descendance de poissons 100 % monosexes femelles. Seulement les néomâles, des femelles génétiques transformées en mâles physiologiques au moyen d'un traitement hormonal, sont utilisés pour féconder les oeufs

physiologiques (normaux) sont facilement identifiables par leur production de laitance. Ils sont éliminés et ne participent pas à la reproduction. Chez les femelles génétiques, certaines n'auront pas été transformées par le traitement hormonal et sont demeurées des femelles physiologiques. Elles produisent des œufs et sont éliminées. Par contre, plusieurs femelles génétiques seront devenues des mâles physiologiques (néomâles) sous l'action de l'hormone, lesquels ont des gonades mâles contenant du sperme à la place des œufs ou à la fois des œufs et du sperme. Le sperme de ces néomâles est utilisé pour féconder des œufs, qui donneront une descendance à 100% femelle en l'absence totale du chromosome Y.

3. Incorporation de l'hormone dans la moulée

La procédure suivante permet de préparer 1 kilogramme de moulée contenant 3 mg d'hormone :

- Peser 3 mg d'hormone au moyen d'une balance de précision de laboratoire;
- Dissoudre ces 3 mg d'hormone avec quelques gouttes d'alcool iso-propyl 70 % (alcool à friction);
- Verser l'hormone dissoute dans 200 ml d'alcool iso-propyl 70 % et bien mélanger;
- Verser le 200 ml d'alcool contenant l'hormone dans un bol à mélanger contenant 1 kg de moulée et bien mélanger de manière à ce que l'alcool contenant l'hormone soit bien incorporé à tout l'aliment;
- Étaler la moulée ainsi préparée en une couche mince sur une feuille de polyéthylène, disposée sur une table dans une pièce bien aérée et chauffée;
- Laisser évaporer ainsi l'alcool pendant une période de 24 heures;
- Une fois l'alcool complètement évaporé, récupérer la moulée dans un bol à mélanger, la diviser en portions suffisantes pour 2 jours de nourrissage, la remiser dans des sacs de polyéthylène ou de petits contenants individuels et la conserver au réfrigérateur ou au congélateur;
- Les portions sont retirées du réfrigérateur ou congélateur au fur et à mesure des besoins.

Mesures de sécurité :
L'utilisation de l'alcool entraîne des vapeurs incommodantes et l'hormone ne doit pas entrer en contact avec la peau pour éviter toute absorption. Il est donc fortement recommandé que l'utilisateur porte des gants de caoutchouc minces et jetables après usage pour se protéger les mains et un masque sur la bouche de manière à éviter l'inhalation des vapeurs d'alcool. Il est important que les manipulations de l'hormone et de l'alcool se fassent dans une pièce bien aérée.

4. Nourrissage des poissons avec la moulée contenant l'hormone

- Un lot d'alevins, qui constituera plus tard un stock de reproducteurs, doit être sélectionné avant le début de l'alimentation et mis dans un bassin à part pour être nourri à l'aliment contenant l'hormone. Le nombre d'alevins à choisir doit tenir compte des pertes totales, pendant le début de l'alimentation et ensuite pendant l'engraissement sur une période de 2 à 3 ans, avant que les poissons n'atteignent la maturité sexuelle;
- L'alimentation des alevins doit être débutée avec l'aliment contenant l'hormone.
- Le lot d'alevins doit être nourri avec l'aliment contenant l'hormone pendant 700 degrés-jours (soit pendant 70 et 88 jours si les températures sont respectivement de 10 °C et de 8 °C) pour la truite arc-en-ciel, et 780 degrés-jours pour la truite mouchetée. Le nombre de de-

grés-jours nécessaires pour l'omble chevalier n'est pas encore déterminé précisément, mais devrait être entre 700 et 780 degrés-jours à l'instar des espèces précédentes. Le lot de poissons est nourri selon les tables de rationnement pour la température de l'eau et selon les pratiques usuelles du producteur (mode de distribution de l'aliment, fréquence des repas).

Nous avons remarqué, à la suite des expériences de cette pratique au Québec, que les entreprises qui disposent de températures de 9 °C à 11 °C pour le début de l'alimentation réussissent mieux l'inversion de sexe que celles qui disposent d'une eau plus froide de 5 °C à 8 °C.

5. Poursuite de l'engraissement des poissons jusqu'à la fraye

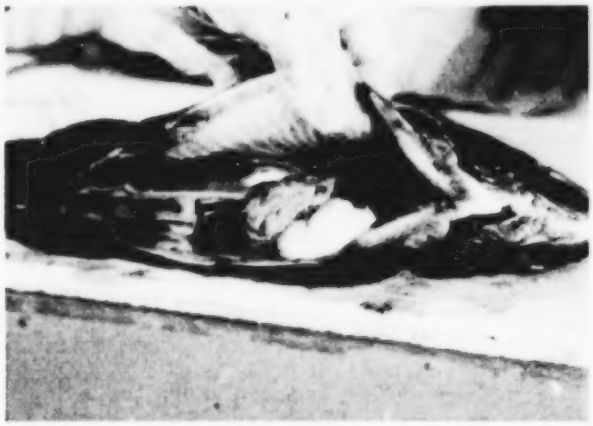
Une fois le traitement hormonal complété, les poissons sont gardés à part et engraissés pour constituer un stock de reproducteurs. L'engraissement de ces poissons doit être favorisé au maximum, de manière à ce qu'ils atteignent la plus grande taille possible à l'âge de la maturité sexuelle.

6. Sélection des néomâles

À l'âge de la maturité sexuelle, les néomâles doivent être sélectionnés. Les mâles et les néomâles ont une apparence extérieure identique. Cependant, les mâles sont faciles à identifier parce qu'ils perdent facilement de la laitance en les manipulant, alors que les néo-mâles ne laissent échapper aucune trace de sperme. En effet, les néomâles ne présentent pas des testicules comme les mâles normaux et il est impossible d'en extraire la laitance par pression. Donc, un poisson qui présente l'apparence extérieure d'un mâle mais dont la laitance ne s'échappe pas, comme on s'y attend normalement, est possiblement un néomâle.

Ces poissons sont alors tués avec un gourdin et la cavité abdominale est ouverte pour l'examen des gonades. Les gonades d'un néomâle sont globuleuses et localisées dans la partie antérieure de la cavité abdominale, comparativement aux gonades oblongues qui occupent toute la longueur de la cavité abdominale chez un mâle normal. Les deux gonades d'un néomâle sont souvent inégales entre elles, souvent une est plus grosse que l'autre, alors que chez le mâle normal les gonades sont le plus souvent d'une taille égale. Les gonades d'un néomâle présentent peu ou pas de conduit pour acheminer le sperme à l'extérieur du poisson (oviducte), ce conduit est le plus souvent atrophié et a l'apparence d'un mince fil, comparativement au mâle normal dont les gonades se prolongent jusqu'à l'orifice urogénital pour laisser sortir le sperme.

L'intervention du traitement hormonal apportant toutes sortes de variations dans le développement des gonades, il peut arriver que pour certains poissons, l'identification d'un néomâle d'une façon certaine soit difficile. Il est très important d'apporter une grande attention à l'identification correcte des néo-mâles, de manière à ne pas contaminer la descendance 100 % femelle recherchée par des mâles. Il vaut mieux éliminer des poissons dont l'identification est incertaine, plutôt que de risquer cette contamination.



7. Utilisation de la laitance des néomâles pour la fécondation des oeufs

Une fois extraites d'un néomâle, les gonades sont épongées avec du papier pour enlever l'excès de sang. Elles sont ensuite déposées dans un petit plat ou assiette pour être lacérées au moyen d'un scalpel ou d'un couteau. La laitance s'en écoule alors dans le plat. Les gonades peuvent aussi être placées dans une petite passoire et pressées avec le dos d'une cuillère pour en extraire le plus possible de laitance.

La pratique de l'insémination artificielle avec un dilueur de sperme permet de faire une meilleure utilisation des gamètes mâles, en fertilisant une plus grande quantité d'oeufs avec moins de laitance. Un dilueur de sperme est une solution saline qui inhibe l'activation et la motilité des spermatozoïdes. La composition du dilueur de sperme est donnée au Tableau 1. Les solutions A et B sont préparées et conservées séparément. Elles ne doivent être combinées ensemble dans les proportions prescrites qu'au moment de l'utilisation. Le dilueur de sperme peut être utilisé à raison de trois volumes de dilueur par volume de sperme. Le sperme ainsi dilué peut être placé dans un contenant recouvert d'un coton fromage et réfrigéré pendant une nuit, pour une utilisation le lendemain. Un volume de 4 à 20 ml de sperme ainsi dilué peut féconder de 15 000 à 20 000 oeufs. Le dilueur de sperme est un liquide physiologique qui doit être réfrigéré pour en assurer la conservation sur une longue période.

8. Test de motilité des spermatozoïdes

Un test de motilité des spermatozoïdes peut être effectué afin de déterminer si la laitance est bonne pour féconder des œuf. Il suffit de prélever quelques gouttes de la laitance du mâle à tester dans un petit récipient. Du fluide ovarien est aussi prélevé d'une femelle. Une goutte de sperme est déposée sur une lame de verre, à laquelle est ajoutée une goutte de fluide ovarien pour diluer le sperme et activer les spermatozoïdes. Une lamelle est déposée sur la préparation et l'observation est faite immédiatement au microscope à un grossissement de 100 X. La motilité des spermatozoïdes doit alors être visible par des petits points noirs qui se déplacent rapidement dans tous les sens. Si aucune motilité n'est perceptible, le sperme n'est pas bon pour réaliser la fécondation. Il est important de faire la mise au point du microscope au préalable, parce que l'intensité lumineuse et la chaleur dégagées par la lampe inhibent les spermatozoïdes en quelques secondes.

Tableau 1 Formulation utilisée pour préparer un diluer de sperme

Produits	Formule chimique	Concentration (g/l)
Chlorure de potassium	KCl	9,0
Chlorure de sodium	NaCl	2,35
Phosphate de sodium monobasique	NaH_2PO_4	0,51
Sulfate de magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	0,29
Chlorure de calcium	$CaCl_2.2H_2O$	0,29
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	5,0
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	5,0

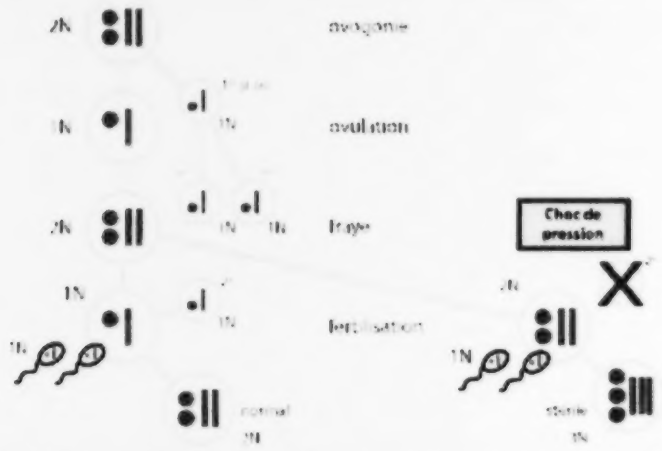


Figure 3 Illustration du procédé de stérilisation des poissons dans le déroulement de l'ovogénèse

9. Stérilisation

Dans des conditions normales, chacune des cellules de la plupart des animaux contient 2 paires de chromosomes (2N), dont l'une provient de la mère et l'autre du père. En l'occurrence, l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel ont respectivement 42 et 30 paires de chromosomes. La stérilisation consiste à produire des individus triploïdes à 3 paires de chromosomes (3N) à la place de 2 paires (2N) normalement. Les poissons triploïdes (3N) sont stériles alors que les diploïdes (2N) sont féconds. L'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel triploïde (3N) ont respectivement 63 et 45 paires de chromosomes dans chacune de leurs cellules.

La stérilisation est réalisée immédiatement après la fécondation au moyen de chocs de température (chocs chauds) ou de pression administrés aux œuf. Ces chocs interfèrent dans le processus normal de la fécondation qui formera un embryon triploïde (3N) à la place de diploïde (2N), lequel deviendra un poisson stérile. Les chocs de température ou de pression empêchent l'expulsion à l'extérieur de l'œuf dans le 2ème globule polaire d'une partie du bagage génétique (1N) qui se produit normalement quelques temps après que l'œuf est fécondé par le spermatozoïde. La figure 3 illustre l'effet des chocs sur l'ovogénèse.

8. Test de motilité des spermatozoïdes

Un test de motilité des spermatozoïdes peut être effectué afin de déterminer si la laitance est bonne pour féconder des œuf. Il suffit de prélever quelques gouttes de la laitance du mâle à tester dans un petit récipient. Du fluide ovarien est aussi prélevé d'une femelle. Une goutte de sperme est déposée sur une lame de verre, à laquelle est ajoutée une goutte de fluide ovarien pour diluer le sperme et activer les spermatozoïdes. Une lamelle est déposée sur la préparation et l'observation est faite immédiatement au microscope à un grossissement de 100 X. La motilité des spermatozoïdes doit alors être visible par des petits points noirs qui se déplacent rapidement dans tous les sens. Si aucune motilité n'est perceptible, le sperme n'est pas bon pour réaliser la fécondation. Il est important de faire la mise au point du microscope au préalable, parce que l'intensité lumineuse et la chaleur dégagées par la lampe inhibent les spermatozoïdes en quelques secondes.

Tableau 1 Formulation utilisée pour préparer un dilueur de sperme

Produits	Formule chimique	Concentration (g/l)
Solution A (4 volumes)		
Chlorure de potassium	KCl	9.0
Chlorure de sodium	NaCl	2.35
Phosphate de sodium monobasique	NaH_2PO_4	0.51
Sulfate de magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	0.29
Chlorure de calcium	$CaCl_2.2H_2O$	0.29
Solution B (1 volume)		
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	5.0
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	5.0

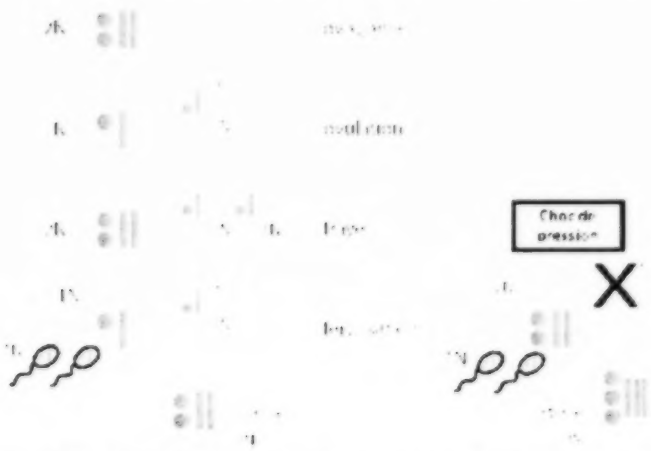


Figure 3 Illustration du procédé de stérilisation des poissons dans le déroulement de l'ovogénèse

9. Stérilisation

Dans des conditions normales, chacune des cellules de la plupart des animaux contient 2 paires de chromosomes (2N), dont l'une provient de la mère et l'autre du père. En l'occurrence, l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel ont respectivement 42 et 30 paires de chromosomes. La stérilisation consiste à produire des individus triploïdes à 3 paires de chromosomes (3N) à la place de 2 paires (2N) normalement. Les poissons triploïdes (3N) sont stériles alors que les diploïdes (2N) sont féconds. L'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel triploïde (3N) ont respectivement 63 et 45 paires de chromosomes dans chacune de leurs cellules.

La stérilisation est réalisée immédiatement après la fécondation au moyen de chocs de température (chocs chauds) ou de pression administrés aux œuf. Ces chocs interfèrent dans le processus normal de la fécondation qui formera un embryon triploïde (3N) à la place de diploïde (2N), lequel deviendra un poisson stérile. Les chocs de température ou de pression empêchent l'expulsion à l'extérieur de l'œuf dans le 2ème globule polaire d'une partie du bagage génétique (1N) qui se produit normalement quelques temps après que l'œuf est fécondé par le spermatozoïde. La figure 3 illustre l'effet des chocs sur l'ovogénèse.

Les chocs chauds de température sont administrés en immergeant les œuf, 15 à 20 minutes après la fécondation, dans un bain d'eau à 28-30 °C pendant quelques minutes. Les chocs de pression consistent à soumettre les œuf, à 300° minutes après la fertilisation (ex. : après 30 minutes à la température de 10 °C), à une pression élevée de 9 000 à 10 000 PSI dans un cylindre étanche, pendant 5 minutes.

10. Références

Benfey, T.J., P.G. Bosa, N.L. Richardson et E.M. Donaldson (1988) Effectiveness of a commercialscale pressure shocking device for producing triploid salmonids. Aquaculture Engineering 7:147-154.

Benfey, T.J., D.J. Martin-Robichaud, C.I. Hendry, C. Sacobie, H. Tvedt et M. Reith (2000) Production of all-female populations of fish for aquaculture. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 100(3) :13-15.

Bye, V.J. et R.F. Lincoln (1986) Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout. Aquaculture 57:299-309.

Dubé, P., J.M. Blanc, M. Chouinard et J. de la Noüe (1991) Triploidy induced by heat shock in brook trout. Aquaculture 92:305-311.

Galbreath, P.F. et G.H. Thorgaard (1993) Sex-reversal, chromosome set manipu-lation and hybridization of salmonids. Part 1. Salmonid 17(1):10-12.

Galbreath, P.F. et G.H. Thorgaard (1993) Sex-reversal, chromosome set manipulation and hybridization of salmonids. Part 2. Salmonid 17(2):10-12.

Galbreath, P.F. et G.H. Thorgaard (1993) Sex-reversal, chromosome set manipulation and hybridization of salmonids. Part 3. Salmonid 17(3):6-7.

Guoxiong, C., I.I. Solar et E.M. Donaldson (1989) Comparison of heat and hydrostatic pressure shocks to induce triploidy in steelhead trout. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences No. 1718.

Solar ,I.I., Donaldson E.M. et G.A. Hunter (1984) Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout by oral administration of 17α-methyltestosterone. Aquaculture 42:129-139.

Station technologique piscicole des eaux douces
200, chemin Sainte-Foy, 12e étage
Québec (Québec) G1R 4X6
Courriel : richard.morin@mapaq.gouv.qc.ca
Adresse Internet : http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche
☎ : (418) 380-2100 poste 3374
📠 : (418) 380-2182

Agriculture, Pêcheries et Alimentation
Québec